

[illegible]

Das Protein stabil auf der Oberfläche präsentiert wird und die Bakterien aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Verfahren zur Identifizierung von Bakterien, die auf der Oberfläche präsentieren und die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch Bakterien, die auf der Oberfläche präsentieren und die genetischen Merkmale *fpt*, *ompT* und *dsbA* aufweisen sowie

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Bakterien zur Herstellung stabiler Fusionsproteine und Verfahren zu deren Nachweis

Die vorliegende Erfindung betrifft Bakterien zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Bakterien den genetischen Marker fpt aufweisen. Der Besitz dieses genetischen Markers erlaubt die verbesserte Herstellung von auf Bakterien destabilisierend wirkenden Proteinfusionen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Bakterien zur Herstellung von Fusionsproteinen, bei denen das Fusionsprotein stabil auf der Oberfläche präsentiert wird und die Bakterien neben dem genetischen Marker fpt die Marker ompT⁻ und dsbA⁻ aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Verfahren zur Identifizierung von Bakterien, die heterologe Proteine mit einer Affinität zu einem Bindungspartner auf ihrer Oberfläche präsentieren und Verfahren zur Konstruktion von diese Proteine codierenden Vektoren. Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch Bakterien, die auf ihrer Oberfläche stabil mindestens ein Fusionsprotein präsentieren und die genetischen Merkmale fpt, ompT⁻ und dsbA⁻ aufweisen sowie deren Verwendung beispielsweise für diagnostische Zwecke. Insbesondere erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren beispielsweise die Produktion von Proteinfusionen, die sich aus Anteilen schwerer und leichter Antikörperdomänen und des Transportproteins Igaß zusammensetzen, und deren Export durch die bakterielle Zellhülle. In einer spezifischen Ausführungsform wird letztlich die Präsentation bindungsaktiver rekombinanter Antikörperfusionen auf der Bakterienoberfläche von Escherichia coli Zellen möglich.

Ein grundlegendes Phänomen biologischer Systeme sind spezifische Wechselwirkungen zwischen Rezeptormolekülen und Liganden. Selbst außerordentlich komplexe Vorgänge in hochentwickelten Organismen lassen sich auf einfache molekulare Interaktionen reduzieren und können auf dieser

-2-

Ebene analysiert und wirkungsvoll beeinflusst werden. Die Spezifität solcher Wechselwirkungen drückt sich in der Affinität zwischen den beteiligten Biomolekülen aus, d.h. der zwischen Rezeptoren und Liganden auftretenden Bindungskräfte.

Um biologische Prozesse gezielt untersuchen und manipulieren zu können, ist es notwendig für unterschiedlichste Rezeptoren und Liganden passende Analoga mit definierten Bindungseigenschaften herzustellen. Zu diesem Zweck werden künstliche Systeme entwickelt, mit denen einerseits auf einfachem Wege die Herstellung einer Vielzahl von Rezeptor- oder Ligandenstrukturen und andererseits die Auslese und gezielte Vermehrung von Molekülen mit definierten Bindungseigenschaften möglich ist. Solche Systeme, in denen mit evolutionsähnlichen Mechanismen Biomoleküle mit definierten Eigenschaften gewonnen werden können, lassen sich auf unterschiedliche Weise verwirklichen. Eine Strategie, die sich eng an Prinzipien lebender Systeme, wie z. B. an das Prinzip der klonalen Selektion im Immunsystem von Säugern anlehnt, besteht in der Kopplung eines auf der Zelloberfläche präsentierten Biomoleküls in Form der codierenden genetischen Information mit dem Vermehrungsapparat lebender Zellen. Die Zellen übernehmen hierbei nicht nur die Aufgabe der Produktion strukturell variabler Biomoleküle sondern ermöglichen auch die Auslese geeigneter Moleküle durch die Präsentation der Biomoleküle auf der Zelloberfläche und im Rahmen ihrer Zellteilung auch die Vermehrung der zugrundeliegenden genetischen Information.

Die materiellen Grundlagen eines solchen Systems bilden sowohl die Produzentenzellen als auch die genetische Information, worin der Bauplan eines Biomoleküls vorgegeben wird. Die Produzentenzellen müssen vermehrungsfähig und gleichzeitig befähigt sein, heterologe genetische Information auszuprägen und die entsprechenden Biomoleküle zugänglich auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Idealerweise sind sie einfach genetisch zu manipulieren, physikalisch-chemisch und genetisch stabil und anspruchslos bezüglich ihrer Wachstumsbedingungen. Ein geeigneter Mikroorganismus, der diese

Bedingungen erfüllt, ist *Escherichia coli*. Als Biomoleküle kommen vorzugsweise Proteine in Betracht. Die zugrundeliegende genetische Information kann sich von wenigen Codons bis zu mehreren Genen erstrecken, abhängig davon, ob ein kurzes Peptid, ein Protein oder ein aus mehreren Proteinmolekülen bestehender Rezeptor kodiert wird. Mit den gängigen molekularbiologischen Methoden kann eine Vielzahl von Proteinvarianten auf der genetischen Ebene erzeugt und die Ausprägung der heterologen Information nach Einbringung in die Produzentenzellen ermöglicht werden.

Wie oben bereits angeführt, ist eine wesentliche Voraussetzung für das Funktionieren eines zellulären Selektionssystems die Präsentation betreffender Proteinmoleküle auf der Zelloberfläche. Die Zugänglichkeit für potentielle Bindungspartner muß gewährleistet sein und die Bindungseigenschaften dürfen durch zelluläre Determinanten nicht beeinträchtigt werden. In *Escherichia coli* wurden verschiedene Systeme zur Präsentation rekombinanter Proteine bearbeitet. Das Hauptmerkmal dieser Systeme ist die Verwendung von Proteinfusionen und der zugrundeliegenden Genfusionen. Neben den Proteinanteilen, die eine betreffende Rezeptor- oder Ligandenstruktur beinhalten, enthalten die Fusionen Trägerproteinanteile. Die Trägeranteile ermöglichen den Export der Proteinfusionen vom Cytoplasma über die beiden Zellmembranen von *E. coli* und ihre Verankerung in der äußeren Membran.

Die Ausprägung von Genfusionen in rekombinanten Zellen wie *E. coli* wird häufig von Problemen begleitet und ist in manchen Fällen nicht möglich. Zwei Gründe können in diesem Zusammenhang angeführt werden: Einerseits kann die Bildung von Proteinfusionen speziell im Zusammenhang mit Membrantransportprozessen zur Beeinträchtigung der Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen führen. Als Folge werden aus einer Population rekombinanter Zellen Mutanten selektioniert, die keine oder eine verringerte Expression der Genfusionen zeigen. Ein bekanntes Beispiel für dieses Problem bilden

Fusionen von Anteilen schwerer Immunglobulinketten mit Trägerproteinanteilen aus dem Protein A (Plückthun et al., Cold Spring Harbor Symposia 52 (1987), 105-112). Das andere häufig zu beobachtende Problem ist die Instabilität der Proteinfusionen nach ihrer Produktion. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Sensitivität rekombinanter Proteine gegenüber Proteasen und die unnatürlichen Faltungseigenschaften solcher Proteinfusionen von Bedeutung. Um dennoch auch solche kritischen Proteinfusionen produzieren zu können, ist es notwendig, durch gezielte Veränderungen den genetischen Hintergrund der Produzentenzellen den Erfordernissen anzupassen. Die Verwendung von Zellen mit verringerter Proteaseaktivität ist nur ein Beispiel.

Für die Präsentation rekombinanter Proteine auf der Zelloberfläche wurden verschiedene Systeme verwendet. Den Transport von Proteinfusionen durch die innere Membran ermöglicht ein Signalpeptid am Aminoende während andere Anteile die Einlagerung und Verankerung in der äußeren Membran übernehmen. Als Trägeranteile wurden in vielen Fällen Proteine der äußeren Membran von *E. coli*, wie z. B. LamB (Charbit et al., EMBO J. 5 (1986), 3029-3037), PhoE (Agterberg et al., Gene 88 (1990), 37-45) und OmpA (R. Freudl, Gene 82 (1989), 229-236) verwendet. Die Anwendungsmöglichkeiten sind in diesen Fällen jedoch stark eingeschränkt da zusätzliche Proteinsequenzen nur in oberflächenexponierten Schlaufen integriert werden können. Einerseits wird dadurch die Länge zusätzlicher Proteinsequenzen limitiert und andererseits werden diese auf beiden Seiten durch Trägerproteinsequenzen eingerahmt, wodurch sowohl Amino- als auch Carboxylende dieser Sequenzen topologisch fixiert sind. Fusionen mit Anteilen des Peptidoglykan assoziierten Lipoproteins (PAL) führen zwar zum Transport zur äußeren Membran, eine Präsentation nativer Proteinsequenzen auf der Oberfläche von *E. coli* wird dadurch jedoch nicht erreicht (Fuchs et al., Bio/Technology 9 (1991), 1369-1372). Ein System mit dem offensichtlich eine Oberflächenpräsentation auch größerer Proteine in *E. coli*

durchgeführt werden kann basiert auf Fusionen mit Anteilen aus Lpp und OmpA. Proteinsequenzen, die an das Carboxylende einer solchen Lpp-OmpA Fusion angehängt werden, sind nach dem Export auf der Oberfläche rekombinanter E. coli Zellen zugänglich (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2713-2717). Die topologische Fixierung des Aminoendes der zu präsentierenden Proteinsequenzen an die membranverankernde OmpA-Sequenz kann sich negativ auswirken, vor allem in Fällen in denen ein freies Aminoende aus funktionellen Gründen notwendig ist.

Eine besondere Stellung bei der Verwendung von E. coli zur Präsentation von Proteinen nehmen Fusionen mit der Transportdomäne des IgA-Proteasevorläufers Igaß ein (Klauser et al., EMBO J. 9 (1990), 1991-1999). Mit diesem Transportsystem lassen sich selbst große Passagierproteine an die Oberfläche von E. coli Zellen befördern, wenn sie am Aminoende mit einem Signalpeptid und am Carboxylende mit der Igaß-Domäne oder mit Teilen dieser Domäne fusioniert werden. Im Gegensatz zu dem oben angeführten Lpp-OmpA-System verfügen die mit Hilfe von Igaß (Membrananker) präsentierten Proteine über ein freies Aminoende während das Carboxylende mit dem Membrananker (Igaß) verbunden ist. Ein wichtiger Faktor, der die Verankerung von Igaß-Fusionen auf der Oberfläche von E. coli Zellen beeinflusst, ist die OmpT-Protease, ein Protein das in der äußeren Membran lokalisiert ist. Ihre zur Oberfläche der Bakterien gerichtete Aktivität führt zur Spaltung von Igaß-Fusionen und damit zur Abkopplung präsentierter Passagierproteine (Klauser et al., EMBO J. 11 (1992), 2327-2335). Durch diese Aktivität wird die physische Kopplung von Bindeeigenschaften der Passagierproteine mit dem Vermehrungsapparat der Zellen unterbunden. Eine Selektion der Produzenten Zellen ist somit ausgeschlossen. Dieser Effekt kann durch die Verwendung von OmpT-negativen E. coli Wirtszellen umgangen werden.

Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Proteinen in E. coli sind bei der Suche und Manipulation von Polypeptiden mit

therapeutischer und diagnostischer Anwendbarkeit von besonderer Bedeutung. Die umfangreichen Erkenntnisse auf den Gebieten der Immunologie und Zellbiologie haben eine Vielzahl von Proteinen als potentielle Kandidaten identifiziert. Eine Proteinfamilie, der in diesem Zusammenhang große Aufmerksamkeit zuteil wird, sind die Immunglobuline. Die Herstellung von Immunglobulinen mit rekombinanten Methoden hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem die Möglichkeit, ganze Antikörperbanken in Mikroorganismen zu etablieren mit der Möglichkeit, geeignete Antikörper neu zu generieren, zu modifizieren, zu selektieren und zu vermehren.

Zum gegenwärtigen Stand der Forschung stellt die Präsentation von Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von filamentösen Bakterionphagen (fd) das am besten entwickelte System dar. Die Antikörperfragmente liegen hierbei in Form von Proteinfusionen mit den Phagen-Hüllproteinen g3p oder g8p vor. In beiden Fällen ist es möglich, aus einer Population rekombinanter Phagen, solche zu selektionieren, die eine gewünschte, durch das oberflächenpräsentierte Antikörperfragment gegebene Spezifität besitzen (Winter and Milstein, Nature 349 (1991), 293-299). Ein entscheidender Nachteil der Verwendung von Phagen als Träger von Antikörperfragmenten gegenüber Bakterienzellen ist, daß Phagen nicht selbst replizieren sondern Wirtsbakterien benötigen, die erst ihre Vermehrung gewährleisten. Die Gewinnung von Phagen mit gewünschten Bindungseigenschaften erfordert daher aufwendige Zyklen von Selektion (Auswahl) und Infektion (Phagen-Vermehrung). Dieser Nachteil tritt bei der Verwendung ganzer Bakterienzellen als Träger rekombinanter Antikörperfusionen nicht in Erscheinung. Ein auf dem Phagen Lambda beruhendes Verfahren zur Identifizierung rekombinanter Antikörper erlaubt hingegen keine Selektion von Spezifitäten sondern erfordert aufwendige Screening-Prozeduren (Lerner et al., Science 252 (1991), 659-667).

-7-

Wie kaum ein anderes System sind die Igaß-Domäne oder C-terminale Anteile dieser Domäne als Membrananker zur Präsentation rekombinanter Antikörperdomänen auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien wie E. coli, Salmonellen und Neisserien prädestiniert. Gegenüber den oben beschriebenen Phagensystemen zeichnet sich ein bakterielles System durch die direkte Kopplung funktioneller, an der Oberfläche präsentierter Antikörper mit dem Vermehrungsapparat lebender Zellen aus. Auf der Ebene der Bakterien besteht neben der Möglichkeit zur direkten Selektion und Manipulation weitergehend die Möglichkeit, größere Mengen funktioneller Antikörperfragmente zu gewinnen. Die Antikörperfragmente können entweder aus dem Cytoplasma in Form von Einschlußkörpern (inclusion bodies) oder aus dem Periplasma als lösliches Protein gewonnen werden. Die im Periplasma vorliegenden Antikörperfragmente sind korrekt gefaltet, von daher biologisch aktiv und können direkt aus Fraktionen des Periplasmas gereinigt werden. Die im Cytoplasma vorliegenden Einschlußkörper bestehen aus denaturierten Antikörperfragmenten, die keine biologische Aktivität zeigen. Letztere erreicht man nach einfacher Aufreinigung der Antikörperfragmente durch De- und Renaturierung. Die rekombinanten Antikörperfragmente sind imstande, Antigen mit einer Affinität zu binden, welche dem nativen Antikörpermolekül gleichkommt.

In Wirtsstämmen tritt jedoch nach Transformation mit Plasmiden, die beispielsweise eine VH-Igaß Fusion ausprägen, eine starke Instabilität dieser Plasmide und Lyse der rekombinanten Bakterien auf. Ein identischer Phänotyp wurde von einer anderen Arbeitsgruppe in Zusammenhang mit dem Export einer Fusion zwischen einer VH-Domäne und dem Protein A von Staphylococcus aureus beschrieben. Dieses Phänomen wird offenbar von der gestörten Signalpeptid-abhängigen Sekretion von VH-Domänen, die an eine Exoprotein-Determinante fusioniert sind, hervorgerufen.

Der vorliegenden Erfindung lag somit das technische Problem zugrunde, Bakterien bereitzustellen, die diese Nachteile nicht aufweisen, das heißt, die allgemein eine erhöhte Stabilität bei der Expression eines aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein gebildeten Fusionsprotein aufweisen. Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen. Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß eine Möglichkeit, die Zell-destabilisierende Wirkung von Fusionsproteinen zu verhindern, der Einsatz bestimmter Wirtszellen darstellt, die den genetischen Marker fpt aufweisen.

Somit betrifft die Erfindung ein Bakterium zur Herstellung von mindestens einem stabilen Fusionsprotein aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei das Bakterium das genetische Merkmal fpt aufweist.

Die Abkürzung fpt bezeichnet erfindungsgemäß eine genetisch determinierte Eigenschaft von E. coli, die zur Toleranz der bei der Expression exportierter Fusionsproteine gelegentlich auftretenden Instabilität der Bakterien führt. Dieser Marker befindet sich zwischen Position 85 und 89 Minuten der Genkarte des E. coli-Genoms. Der genetische Marker fpt kann zur Herstellung von Bakterien, die tolerant gegenüber Fusionsproteinen sind, verwendet werden.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "Trägerprotein" Aminosäuresequenzen innerhalb eines Fusionsproteins, die nicht zum Passagierprotein gehören und die für die Lokalisation und die Stabilität des Fusionsproteins in den Bakterien von Bedeutung sind. Für Fusionsproteine, die auf der Bakterienoberfläche präsentiert werden, beinhalten die Trägerproteinanteile ein Signalpeptid am Aminoende der Fusionen und die Igaß-Transprotodomäne am Carboxylende der Fusionen. Für Fusionsproteine, die ins Periplasma transportiert werden, beinhalten die Trägerproteinanteile ein Signalpeptid am Aminoende der Fusionen.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "Passagierprotein" Aminosäuresequenzen innerhalb eines Fusionsproteins, die nicht zum Trägerprotein gehören. Für Fusionsproteine, die auf der Bakterienoberfläche präsentiert werden, beinhalten die Passagierproteinanteile diejenigen Sequenzen, die mit Bindungspartnern interagieren.

Die Herstellung eines optimierten E. coli Wirtsstamms, der eine stabile Oberflächenpräsentation von Fusionsproteinen ermöglicht, erfordert neben der Existenz dieser Mutation die Einführung zusätzlicher genetischer Veränderungen. In Untersuchungen zur Sekretion von Igaß-Fusionsproteinen in E. coli wurde gezeigt, daß die Igaß-Domäne in der äußeren Membran durch OmpT-Protease gespalten und somit das Passagierprotein vom Membrananker Igaß abgekoppelt wird. Desweiteren ist die Translokation von Passagierproteinen auf die Zelloberfläche nur in ihrer entfalteten Konformation möglich. Erfolgt die Igaß-vermittelte Sekretion variabler Antikörperdomänen in E. coli K12 Wildtypstämmen oder in E. coli (ompT⁻), werden die Immunglobulinanteile von unspezifischen periplasmatischen Proteasen degradiert. Die Ursache stellt die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken in den Passagierproteinen durch die periplasmatische Disulfid-Oxidoreduktase DsbA dar. Diese Blockade der Translokation von Passagierproteinen durch die äußere Membran wird in bakteriellen Zellen, die eine Mutation im dsbA Gen tragen, nicht beobachtet.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung daher ein Bakterium mit dem genetischen Marker fpt, wobei das Fusionsprotein stabil auf der Oberfläche präsentiert wird, das Bakterium gram-negativ ist und außerdem die genetischen Marker ompT⁻ und dsbA⁻ aufweist.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "auf der Oberfläche präsentiert" die Lokalisation eines Fusionsproteins bzw. des Passagierproteins auf der dem Medium zugewandten Seite der äußeren Bakterienmembran. An der Oberfläche präsentierte

Passagierproteine sind in intakten gram-negativen Bakterien für Bindungspartner frei zugänglich.

Die Abkürzung ompT^- bezeichnet eine genetische Veränderung von *E. coli* Zellen, die zu einer Defizienz in der proteolytischen Aktivität der Protease OmpT führt.

Die Abkürzung dsbA^- bezeichnet eine genetische Veränderung von *E. coli* Zellen, die zu einer Defizienz in der Aktivität der periplasmatischen Oxidoreductase DsbA führt. Erfindungsgemäß ist der Begriff dsbA^- so zu verstehen, daß dieser nicht nur eine Defizienz in der Aktivität durch eine genetische Veränderung der Oxidoreductase DsbA selbst, sondern auch durch andere Faktoren, die die Aktivität dieser Oxidoreductase indirekt inhibieren, mit einschließt.

Die Vereinigung der Mutationen in den drei angesprochenen Genen im Chromosom einer Bakterienzelle erfolgte erfindungsgemäß in *E. coli* UT5600 (ompT^-). *E. coli* UT5600 ist selbst schon in einem Gen (ompT) mutiert. Die Übertragung der Mutation im dsbA Gen nach *E. coli* UT5600 erfolgte von *E. coli* JCB571 ($\text{dsbA}::\text{Kan}$; $\text{zih12}::\text{Tn10}$) mit Hilfe von Phagen P1-Transduktion. Positive Transduktanten wurden auf die Kotransduktion einer, nahe dem dsbA Genlokus gelegenen Transposon Tn10 Insertion, selektioniert. Dadurch wurde auch die durch angrenzende DNA-Abschnitte determinierte Eigenschaft übertragen, die es einer *E. coli* Zelle ermöglicht, z.B. VH-IgaB Fusionen stabil zu produzieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Bakterium zur Herstellung eines Fusionsproteins verwendet, wobei das im Fusionsprotein erhaltene Trägerprotein das IgaB-Protein enthält oder ein Fragment davon, das die Sezernierung des Fusionsproteins ermöglicht.

Die Abkürzung IgaB bezeichnet die am Carboxylende des *Neisseria* IgA-Proteasevorläuferproteins gelegene Transportdomäne. Diese Domäne vermittelt den Transport aminoterminal

angekoppelter Proteine vom Periplasma gramnegativer Bakterien durch die äußere Membran.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das von dem erfindungsgemäßen Bakterium hergestellte Passagierprotein ein Protein mit einer Affinität für einen Bindungspartner, ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers, ein Antigen, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Inhibitor, ein Rezeptor, ein Ligand oder ein Nucleinsäure-bindendes Protein.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "Bindungspartner" ein Molekül, eine chemische Verbindung oder ein Makromolekül. Bindungspartner können sowohl frei löslich, gebunden an eine Matrix oder aber assoziiert mit einer biologischen Membran vorliegen.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "Antigen-bindende Domäne" mindestens den Anteil eines Antikörpermoleküls, der hinreichend für die spezifische Bindung eines Antigens ist.

Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht die stabile Produktion und Präsentation von Immunglobulindomänen auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien. Die praktische Durchführung ist auf zwei verschiedenen Wegen möglich. Entweder erfolgt der Export der variablen Antikörperdomänen als monomere ("single-chain Fv") scFv-IgA Fusion, in der die Domänen VL und VH durch ein kurzes Peptid (z.B. ein $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ -Linker) kovalent verbunden sind oder als zwei getrennte VL- und VH-IgA Fusionen innerhalb einer Bakterienzelle. Im letzteren Fall lagern sich die Antikörperanteile beider Fusionen auf der Zelloberfläche zu einem funktionellen Fv-Fragment zusammen. Die Verwendung verschiedener E. coli K12 Stämme führte mit den VL- und scFv-IgA Konstrukten zu stabilen Transformanten.

In der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das zur Herstellung des Fusionsproteins verwendete Bakterium der Stamm E. coli JK 321. Dieser Stamm wurde am 22. Dezember 1993 gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, 38124 Braunschweig, Mascheroder

Weg 1b, Deutschland) unter der Hinterlegungsnummer DSM 8860 hinterlegt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung des genetischen Markers fpt zur Erzeugung einer Toleranz von Bakterien gegenüber Fusionsproteinen.

Die Entwicklung von Stämmen, die diesen Marker enthalten, der die stabile Oberflächenexposition von Fusionsproteinen ermöglicht, bietet eine Reihe von Einsatzmöglichkeiten. So ist es zu Beispiel denkbar, mit Hilfe eines beliebigen Antigens aus einer Immunglobulin-Igαß Bibliothek einen bestimmten E. coli Clon mit bestimmten Eigenschaften zu selektionieren.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung eines Verfahrens zur Identifizierung von Bakterien, die Proteine mit einer Affinität für einen Bindungspartner stabil auf ihrer Oberfläche präsentieren, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Konstruktion mindestens eines Vektors mit mindestens einer DNA-Sequenz, die ein Fusionsprotein aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein codiert, das stabil an der Oberfläche der Bakterien präsentiert werden kann;
- (b) Einbringen des Vektors in diese Bakterien;
- (c) Anzucht des Bakteriums aus Schritt (b), so daß die Bakterien der erhaltenen Kultur auf ihrer Oberfläche das Fusionsprotein oder die Fusionsproteine stabil präsentieren;
- (d) Isolierung von Bakterien, die das gewünschte Fusionsprotein oder die Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Die Präsentation von mehr als einem Fusionsprotein auf der Zelloberfläche kann beispielsweise in solchen Fällen wünschenswert sein, in denen einzelne Ketten multimerer Proteine getrennt exprimiert werden und diese sich dann auf

der Zelloberfläche zu einem funktionellen Komplex zusammenlagern.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird zur Konstruktion des Vektors in Schritt (a) eine Bank von DNA-Sequenzen verwendet, in der die jeweiligen DNA-Sequenzen Varianten des Passagierproteins oder der Passagierproteine codieren, oder Varianten des Trägerproteins bzw. der Trägerproteine.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "Varianten von Passagierproteinen" von Passagierproteinen abweichende Aminosäuresequenzen mit bezüglich eines Bindungspartners modifizierten Bindungseigenschaften.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "Varianten von Trägerproteinen" in ihrer Aminosäuresequenz modifizierte Trägerproteine, die veränderte Transporteigenschaften bezüglich angekoppelter Passagierproteine aufweisen.

Durch die Konstruktion von Varianten des Passagierproteins könnte zum Beispiel ein Antikörperfragment mit gegebener Spezifität durch gerichtete Mutagenese bezüglich einer bestimmten Anwendung optimiert werden. Eine evolutionsähnliche Anpassung an einen externen Faktor durch ungerichtete Mutationen ist durch kontinuierliche Züchtung von *E. coli* Kulturen möglich. Weiterhin können nicht nur Antikörperfusionen mit diesem Verfahren bearbeitet werden, sondern auch enzymatische Aktivitäten präsentiert, selektioniert und modifiziert werden. Die Erzeugung von Varianten des Trägerproteins kann eine bessere Adaption an ein gegebenes Passagierprotein oder dessen Varianten ergeben, was die Sezernierung des Fusionsproteins erleichtern kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens erfolgt die Anzucht des Bakteriums in Schritt (c) unter Bedingungen, bei denen die das Fusionsprotein bzw. die die Fusionsproteine codierende DNA-Sequenz mutiert wird, so daß die Bakterien der erhaltenen Kultur Varianten des

Fusionsproteins oder der Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Erfindungsgemäß bezeichnet der Begriff "mutierende Bedingungen" Kultivierungsbedingungen unter denen es durch Zusatz chemischer Substanzen und/oder Einwirkung ionisierender Strahlung zu einer erhöhten Mutationsrate in Bakterienkulturen kommt.

In einer bevorzugten Ausführungsform diese Verfahrens enthält das im Fusionsprotein enthaltene Trägerprotein das Igaß-Protein oder ein Fragment davon, das die Sezernierung des Fusionsproteins ermöglicht.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens ist das Protein mit einer Affinität für einen Bindungspartner ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers, ein Antigen, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Inhibitor, ein Rezeptor, ein Ligand oder ein Nucleinsäure-bindendes Protein.

Schließlich können in einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens die Bakterien, die das gewünschte Fusionsprotein stabil auf ihrer Oberfläche präsentieren, durch Interaktion mit dem an eine Matrix gebundenen Bindungspartner des Passagierproteins, durch Interaktion mit einem fluoreszenz-markierten Bindungspartner oder durch Interaktion mit dem an Magnetpartikel gebundenen Bindungspartner des Passagierproteins isoliert werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von gram-negativen Bakterien, die auf ihrer Oberfläche stabil mindestens ein Fusionsprotein präsentieren und die genetischen Marker *fpt*, *ompT*⁻ und *dsbA*⁻ aufweisen.

Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft Bakterien, bei denen das im Fusionsprotein enthaltene Trägerprotein das Igaß-Protein enthält oder ein Fragment davon, das die Sezernierung

des Fusionsproteins ermöglicht und/oder das Passagierprotein ein Protein mit einer Affinität für einen Bindungspartner, ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers, ein Antigen, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Inhibitor, ein Rezeptor, ein Ligand oder ein Nucleinsäure-bindendes Protein ist.

Schließlich ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung die Verwendung dieser Bakterien für diagnostische Zwecke, zur Herstellung von Proteinen mit einer Affinität für einen Bindungspartner, zur Waschmittelherstellung, zur Erschließung von Rohstoffen, zur Lebensmittelverarbeitung oder zum Abbau oder der Anreicherung von Schadstoffen.

Beispielsweise können die erfindungsgemäßen, spezifische Antikörperfragmente präsentierenden Bakterien zur Gewinnung dieser Antikörperfragmente verwendet werden und diese dann, gegebenenfalls nach Aufreinigung, im diagnostischen oder therapeutischen Bereich eingesetzt werden. Rekombinante Antikörperfragmente, die beispielsweise spezifisch Oberflächenstrukturen von Tumorzellen erkennen, können in Verbindung mit einem Radionuklid oder einem wirksamen Toxin für therapeutische Anwendungen eingesetzt werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren selektionierte Bindungsspezifitäten könne durch gentechnische Übertragung der CDR (complementarity determining regions) Regionen in menschliche Immunglobulinketten eingepflanzt ("humanisiert") werden und zur Therapie von Krankheiten verwendet werden.

Beschreibung der Figuren

Fig. 1: Schematische Darstellung der Strategie zur Konstruktion der VH-igaß Fusion in Plasmid pJK165. Im Zuge der Konstruktion von Plasmid pJK165 wurde das VH-Genfragment am 5'-Ende mit der Signalsequenz des ompA Gens und am 3'-Ende mit dem igaß Genfragment fusioniert. Die hierzu benötigten DNA-Fragmente wurden in einer Drei-Fragmente-Ligation miteinander verbunden.

-16-

Die Synthese der nicht-kodierenden Region und der Signalsequenz des ompA Gens von E. coli DH5a erfolgte mit Hilfe chromosomaler DNA als Matrize und den Oligonukleotiden JK20 und JK21 (Abb. 8) durch PCR. Das erhaltene PCR-Fragment wurde ohne vorherige Inkubation mit Restriktionsenzymen direkt in den pCR1000-Vektor inseriert (pJK129). Die Synthese des VH-Genfragments erfolgte ebenfalls durch PCR wobei in diesem Fall die entsprechende cDNA als Matrize diente und die Oligonukleotide JK09 und JK17 (Abb. 8) eingesetzt wurden. Das erhaltene PCR-Fragment wurde danach mit Klenow-Polymerase inkubiert, um überstehende Enden aufzufüllen und nach Restriktion mit EcoRI in die HincII/EcoRI Schnittstellen des pEMBL8-Vektors inseriert. Aus dem gewonnenen Plasmid pJK92 wurde das XhoI/EcoRI VH-Genfragment isoliert und zusammen mit dem ClaI/XhoI ompA-Genfragment und einem XhoI/EcoRI-Vektorfragment aus pTK59 ligiert. Das gebildete Plasmid pJK165 kodiert eine VH-igaß Fusion, deren "-10-Region" des Promoters gemäß dem Ausgangsplasmid pTK59 rekonstituiert wurde.

Fig. 2: Schematische Darstellung der Strategie zur Konstruktion der VL-igaß Fusion in den Plasmiden pJK78 sowie pJK257.

a.) Das Plasmid pJK78 entstand durch den Einbau eines DNA-Fragments mit dem VL-Genfragment eines monoklonalen Antikörpers in das NdeI/EcoRI-Vektorfragment des Plasmids pTK59. Zunächst wurde das VL-Genfragment mit Hilfe der Oligonukleotide JK08 und JK14 (Abb. 8) in einer Polymerase-Ketten-Reaktion erzeugt und in den pCR1000-Vektor kloniert (pJK56). Das entsprechende DNA-Fragment des VL-Gens wurde an den durch die Oligonukleotide an den 5'- und 3'-Enden eingeführten NdeI- und EcoRI-Schnittstellen prozessiert und mit dem NdeI/EcoRI-Vektorfragment des Plasmids pTK59 ligiert. Das entstandene Plasmid wurde als pJK78 bezeichnet.

b.) Der Austausch des Gens der b-Lactamase (bla) und des ColEI Replikationsorigins auf dem Plasmid pJK78 erfolgte in zwei Etappen. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe der Oligonukleotide JK32 und JK33 (Abb. 8) das Gen der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (cat) von Plasmid pACYC184 durch PCR amplifiziert.

Das gewonnene PCR-Fragment wurde in das mit HindIII geschnittene pJK78-Vektorfragment kloniert. Das resultierende Plasmid pJK250 zeichnet sich durch das Vorliegen zweier Resistenzgene (bla und cat) sowie den ColE1 Replikationsorigin aus. Durch Restriktion mit ClaI und NheI wurde aus pJK250 das Vektorfragment (bla und ColE1) deletiert und durch ein ClaI/NheI-Fragment (p15A-Origin) aus dem Plasmid pACYC184 substituiert. Das hierbei entstandene Plasmid pJK257 kodiert eine VL-iga_B Fusion und erlaubt seine Koexpression mit dem Plasmid pJK165 (VH-iga_B) innerhalb von E. coli JK321 Zellen.

Fig. 3: Struktur von wesentlichen Sequenzmotiven der verwendeten VH- und VL-iga_B Fusionen: Alle dargestellten Konstrukte sind Derivate des Plasmids pTK59 und zeigen verschiedene wichtige Übergangsbereiche der jeweiligen Fusionen. (i) Das VH-iga_B Konstrukt pJK165 entstand durch Substitution des ClaI/EcoRI-Fragments von pTK59 durch das VH-Genfragment und einem DNA-Fragment, das die ersten 204 Basenpaare des E. coli ompA Transkripts kodiert. Dadurch verfügt die VH-Iga_B Fusion an ihrem N-Terminus über das Signalpeptid des OmpA Vorläuferproteins. (ii) Das VL-iga_B Konstrukt pJK78 entstand durch Insertion des VL-Genfragments in die NdeI/EcoRI Schnittstellen von pTK59; die hierbei gebildete VL-Iga_B Fusion trägt folglich das CtxB Signalpeptid. (iii) In Plasmid pJK257, einem VL-iga_B Derivat von pJK78, wurde das Vektorfragment (bla und ColE1) durch die cat und p15A Marker des Plasmids pACYC184 ersetzt, wodurch die Koexpression der Plasmide pJK257 und pJK165 innerhalb einer Zelle ermöglicht wird. Die Übergangsbereiche in dieser VL-iga_B Genfusion sind identisch zu pJK78 und werden daher nicht gesondert aufgeführt. Die Spaltstellen der Signalpeptidase sind durch Pfeile gekennzeichnet. Um eine effiziente Prozessierung durch die Signalpeptidase zu gewährleisten, wurden zwei Aminosäuren der nativen OmpA- und CtxB-Proteine am N-Terminus der Antikörperdomänen belassen (durch Sterne bezeichnet). Kursiv geschriebene Ziffern geben jeweils die erste und letzte Aminosäureposition der variablen Antikörperdomänen in den Iga_B-Fusionen und fett gedruckte Aminosäuren die eingeführte

Spaltstelle der IgA-Protease an (Pohlner et al., Bio/Technology 10 (1992), 799-804).

Fig. 4: Sensitivität der oberfläch exponierten Antikörperdomänen gegenüber Trypsin in physiologisch intakten E. coli JK321. Die Immunoblotanalyse von JK321 Zellysaten mit den Plasmiden pTK59 (Spur 1 und 4), pJK78 (Spur 2 und 5), pJK165 (Spur 3 und 6) mit anti-Fp42 zeigt die Igaß-Hybridproteine vor (Spuren 1 bis 3), sowie nach Inkubation der rekombinanten Bakterien mit Protease (Spuren 4 bis 6). Die Analyse der Zellysate mit anti-OmpA Serum (Spuren 7 bis 9) zeigt, daß in den einzelnen Bakterienklonen das periplasmatische Carboxylende des OmpA Proteins für Trypsin nicht zugänglich ist und bestätigt somit die extrazelluläre Lokalisierung der Antikörperdomänen.

Fig. 5: Nachweis von α -Protein auf der Oberfläche antikörperpräsentierender E. coli JK321 durch Immunfluoreszenz-Markierung. Rekombinante E. coli JK321 Zellen, die Genfusionen zwischen ctxB-igaß (Plasmid pTK59) sowie VH- und VL-igaß (Plasmide pJK165 und pJK257) exprimierten, wurden über Nacht bei 28°C in LB-Medium, pH=8,5, in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol (7,5 mM) und den jeweils benötigten Antibiotika angezogen. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Bakterien in PBS/BSA (1%) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche abzusättigen. Nach Zugabe des spezifischen Antigens (α -Protein, 100 ng/ml) wurde die Zellsuspension für weitere 30 Min in einen Drehinkubator gestellt und danach einmal in PBS gewaschen. Oberflächengebundenes Antigen wurde mit Paraformaldehyd (1%)/Glutaraldehyd (0,5%) fixiert und mit antigenspezifischem, polyklonalem Serum (anti-Fp80) und FITC-gekoppeltem Maus-anti-Kaninchen-IgG Serum nachgewiesen.

Fig. 6: Schematische Darstellung eines Verfahrens zum Nachweis der antikörperpräsentierenden E. coli JK321. Um die Anreicherung spezifischer, VL-/VH-Igaß produzierender E. coli JK321 Zellen durch das spezifische Antigen verfolgen zu können, tragen diese rekombinanten Bakterien einen Rifampicin-

Marker (Rif) im Chromosom, der ihr selektives Wachstum auf Nährplatten (Rif) ermöglicht. Demgegenüber wachsen die Kontrollzellen nur auf Rif-freiem Medium. Somit kann aus dem Verhältnis der Rif-resistenten zu Rif-sensitiven Bakterienkolonien die selektive Anreicherung der spezifischen VL-/VH-Igα koexprimierenden JK321 Zellen bestimmt werden. Im Schema werden zu Beginn der Selektion die spezifischen, Rif-resistenten *E. coli* JK321 in einem Verhältnis von 1:10000 gegen Kontrollzellen *E. coli* UT5600, die VL-/VH-Igα Fusionen anderer Antigenpezifität produzieren, verdünnt und in Wachstumsmedium kultiviert. Anschließend werden die spezifischen *E. coli* JK321 mit Hilfe von immobilisiertem Antigen aus der Zellsuspension "gefischt", in frisches Nährmedium überführt und erneut angezogen. Diese Prozedur wird mehrmals wiederholt und jedesmal ein Aliquot auf Nährplatten mit und ohne Rifampicin ausplattiert. Dabei sollte eine kontinuierliche Zunahme Rif-resistenter gegenüber Rif-sensitiver Bakterienklone beobachtet werden.

Fig. 7: Selektive Anreicherung VL-/VH-Igα koexprimierender *E. coli* JK321 durch antigenmarkierte Nitrocellulose. Nach Auftrennung von α-Protein (etwa 10 ng/Spur) durch SDS-PAGE wurde das Antigen anschließend auf Nitrocellulose geblottet. Ein Nitrocellulosestreifen wurde mit anti-Fp80 als Immunoblot entwickelt, um die exakte Position der α-Protein Bande sichtbar zu machen. Zur Durchführung des Bindungsexperiments wurden die *E. coli* Stämme UT5600 (pTK59; Rif^S), JK321 (pTK59; Rif^R) und JK321 (pJK165/pJK257; Rif^R) über Nacht als Flüssigkulturen angezogen. Bei einer O.D.₆₀₀ von 0,8 wurden die beiden rekombinanten, Rif-resistenten JK321 Stämme in einem Verhältnis von etwa 1:2000 gegen den Rif-sensitiven Stamm UT5600 (pTK59) verdünnt. Nach Inkubation der Bakteriensuspension in PBS/BSA (1%) für 30 Minuten wurde davon 1 ml in 15 ml PBS gegeben und zusammen mit einem Nitrocellulosestreifen in eine leere Petrischale gegeben. Nach Inkubation unter leichtem Schütteln für 30 Minuten bei RT

-20-

wurde dreimal mit PBS (20 ml) gewaschen und anschließend die Nitrocellulose auf Rif-haltigen Nährplatten inkubiert.

Fig. 8: DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Verwendungszweck ^a	Länge (bp)	Sequenzabfolge (5' nach 3')
JK008	PCR (-)	35	GCAGCAGAATTCCGTTTCAGCTCCAGCTTG GTCCC
JK009	PCR (-)	44	GCAGCAGAATTCGCAGAGACAGTGACAGT (G/A) GTGCCTTGGCCCCA
JK014	PCR (+)	44	GGTTATGCATATGCACATGGAACACCTGAT (A/G) TTGTGAT (G/A) ACCCA
JK017	PCR (+)	50	GGTTATGCATATGCACATGGAACACCTCAG GTCCAACTTCTCGAGTCAGG
JK020	PCR (+)	44	GCAGCAATCGATGAGTAATACTTGCGCGCC AAGGGTGCTCGGCA
JK021	PCR (-)	42	TGCTGCCTCGAGAAGTTGGACCTGCGGAGC GGCCTGCGCTAC
JK032	PCR (-)	50	GCAGCAAGCTTCGGACGGCATTTTTGATCA CCCGACGCACTTTGCGCCGA
JK033	PCR (+)	30	GCAGCAAGCTTCAGGGCTAGCACCAGGCGT

^a (+) und (-) beziehen sich auf den kodierenden bzw. den dazu komplementären DNA-Strang.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung

Beispiel 1

Herstellung des E. coli Stamms JK321 durch Übertragung ein r Stabilitätsdeterminante mit Hilfe von P1-Phagen- Transduktion.

Zur Igaß-Domäne-vermittelten Präsentation variabler Antikörperfragmente oder anderer pharmakologisch relevanter Proteine auf der Zelloberfläche von E. coli ist es erforderlich, die Gene mehrerer Enzyme, die im Periplasma und der äußeren Membran lokalisiert sind, zu inaktivieren. Hierbei sind insbesondere die periplasmatische Disulfid-Oxidoreduktase (DsbA) (Bardwell et al., Cell 67 (1991), 581-589) oder eine äußere Membran-Protease (OmpT) (Earhart et al., FEMS Microbiol. Let 6 (1979), 277-280); Grodberg und Dunn, J. Bacteriol. 171 (1989), 2903-2905) anzuführen. Neben der Inaktivierung dieser beiden Faktoren ist es jedoch speziell für die Igaß-vermittelte Oberflächenexposition der variablen schweren Antikörperdomäne (VH) notwendig, zusätzlich ein weiteres Gen im E. coli Genom auszuschalten. Anderenfalls übt dieses VH-Igaß Fusionsprotein eine cytotoxische Wirkung auf die E. coli K12 Wirtszellen aus. Bei der Herstellung des E. coli Stammes JK321 wurde ein Abschnitt des Genoms eines E. coli Stammes (JCB571) (Bardwell, a.a.O.), der eine Mutation in einem nicht näher bekannten Gen trägt, in einen anderen E. coli Stamm (UT5600) (Earhart, a.a.O.) überführt. Erst die Einführung dieser Mutation ins Genom von E. coli K12 ermöglicht in diesen genetisch veränderten Wirtszellen die stabile Produktion von VH-Igaß Fusionsproteinen.

Ein Verfahren, größere Fragmente der chromosomalen DNA zwischen zwei E. coli Stämmen auszutauschen, bildet die Transduktion mittels P1-Phagen, die gewöhnlich zur Kartierung von Genen auf dem Chromosom eingesetzt wird (Taylor und Trotter, Bacteriol. Reviews 31 (1967), 332-344). Wenn sich P1-Phagen in Bakterienzellen vermehren, verpacken sie nicht nur virale DNA, sondern gelegentlich auch ein Stück des Wirtszell-Genoms in die

Virushülle. Die Länge der eingepackten Bakterien-DNA beträgt bis zu 2 Minuten des E. coli Genoms, was die Kotransduktion von zwei entfernten genetischen Markern ermöglicht. Gelangt diese Wirtszellen DNA in einer darauffolgenden P1-Infektion in eine andere Bakterienzelle, kann dieses DNA-Fragment dort in das Chromosom rekombinieren.

Zur Durchführung der P1-Transduktion wurde E. coli JCB571 (dsbA::Kan, zih12::Tn10) als Donor- und E. coli UT5600 (ompT⁻) als Rezipientenstamm ausgewählt. Im Anschluß an die Herstellung eines JCB571-spezifischen P1-Phagenlysats und der Infektion von UT5600 Zellen, wurden positive Transduktanden, welche den mutierten unbekannten Genlokus in Verbindung mit dem mutierten dsbA Gen kotransduziert und in ihr Chromosom integriert hatten, durch Wachstum auf Nährmedium mit Kanamycin und Tetracyclin selektiert. Aufgrund der nahen Lokalisierung des dsbA (Kan) Gens und einer Transposon Insertion zih12::Tn10, (Tet) zu der, für die VH-Iga β Stabilisierung verantwortlichen Mutation im E. coli Chromosom, waren diese zwei Antibiotika Resistenzen (Kan und Tet) als Marker für die Kotransduktion verwendet worden. Der auf diesem Wege hergestellte Klon (E. coli JK321) zeigte die, zuvor nur in E. coli JCB570 (wt) und JCB571 (dsbA) beobachtete Toleranz gegenüber der VH-Iga β Fusion. Nach Transformation mit den Plasmiden pJK78 (VL-Iga β) und pJK165 (VH-Iga β) konnte die stabile Expression dieser Iga β Fusionsproteine in E. coli JK321 gezeigt werden (Abb. 4). Ebenfalls ermöglicht der Stamm JK321 die simultane Koexpression der Plasmide pJK78 (VL-Iga β) und pJK165 (VH-Iga β) innerhalb einer Bakterienzelle.

Beispiel 2

Konstruktion einer VH-iga β Genfusion und Expression in E. coli JK321.

Zur Präsentation rekombinanter Antikörper-Fragmente auf der Zelloberfläche von E. coli JK321 ist es erforderlich, die VH- oder VL-Domänen mit verschiedenen Transportsignalen zu versehen. In den hergestellten Proteinfusionen tragen daher die

Antikörperdomänen am N-Terminus ein Signalpeptid, das den Transport der Fusionsproteine durch die cytoplasmatische Membran gewährleistet und am C-Terminus die Igaß-Domäne, die anschließend den Transport der Antikörperdomänen durch die äußere Membran vermittelt.

Die Konstruktion der Fusion zwischen einem VH-Genfragment und igaß erfolgte in Plasmid pJK165 (Abb. 13). Hierbei wurde die Region des ompA Gens von *E. coli* (Movva et al., J. Biol. Chem. 255, (1980), 27-33), die für die Signalsequenz kodiert, mit dem 5'-Ende von igaß verbunden. Zur Amplifizierung der Region, die für die ompA Signalsequenz kodiert und der davor befindlichen nicht-kodierenden Region (Cole et al., Mol. Gen. Genet. 188, (1982), 472-479) in einer PCR, wurde die Struktur des 5'-terminalen Oligonukleotids JK20 (Abb. 8) so gewählt, daß nach Insertion des entsprechenden Genfragments in die ClaI-Schnittstelle von pTK59 die "-10-Region" des P_{TK}-Promoters zur Expression von igaß Genfusionen vollständig rekonstituiert wurde (Klauser et al., EMBO J. (1990), 1991-1997). Das 3'-terminale Oligonukleotid JK21 (Abb. 8) wurde mit einer XhoI-Schnittstelle versehen, welche die Fusion mit dem 5'-Ende des VH-Genfragments ermöglichte. Dazu wurde mit Hilfe der Oligonukleotide JK17 und JK09 (Abb. 8) ein VH-Genfragment durch PCR amplifiziert und über eine XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende mit dem ompA-spezifischen DNA-Fragment und über eine EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende mit igaß fusioniert. Das hieraus gebildete Plasmid wurde mit pJK165 bezeichnet (Abb. 1).

Nach Transformation von *E. coli* JK321 mit Plasmid pJK165 wird eine hohe Stabilität der rekombinanten Bakterien beobachtet. Dieser Effekt tritt in rekombinanten *E. coli* K12 Wildtyp-Zellen nicht auf. In *E. coli* K12 Wildtyp-Zellen, welche das Plasmid pJK165 tragen, wird aufgrund einer cytotoxischen Wirkung des VH-Igaß Fusionsproteins eine Destabilisierung der rekombinanten Bakterien und die Bildung von Mutanten beobachtet, die das VH-Igaß Fusionsprotein nicht mehr synthetisieren. Der molekulare Hintergrund dieser Mutationen stellt der Zerfall des Plasmids pJK165 in ein kleineres Derivat dar, von dem aus die VH-igaß Fusion nicht mehr exprimiert wird.

-24-

Beispiel 3

Konstruktion einer VL-igaß Genfusion und Expression in E. coli JK321.

Zur simultanen Oberflächenpräsentation von VH- und VL-Igaß Fusionsproteinen innerhalb einer Bakterienzelle war es erforderlich, neben der, unter Punkt 2.) beschriebenen VH-Igaß Fusion, auch eine Fusion zwischen der VL-Domäne eines Antikörpers und Igaß herzustellen. Die Konstruktion einer VL-igaß Fusion erfolgte in zwei Stufen (Plasmide pJK78 und pJK257): Im ersten Schritt wurde die VL-Domäne am N-Terminus mit einem Signalpeptid und am C-Terminus mit der Igaß-Domäne verbunden (Plasmid pJK78). Das Signalpeptid gewährleistet den Transport des Fusionsproteins durch die cytoplasmatische Membran und die Igaß-Domäne vermittelt anschließend den Transport der VL-Antikörperdomäne durch die äußere Membran. Im zweiten Schritt erfolgte der Austausch des ColE1-Replikationsorigins und des Gens der β -Lactamase (bla) im Plasmid pJK78 gegen den pA15-Replikationsorigin und das Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (cat) des Klonierungsvektors pACYC184 (Rose, Nucl. Acid Res. 16 (1978), 355) im Plasmid pJK257. Die detaillierte Konstruktion beider Plasmide ist in den Legenden zu Abb. 2a/b sowie Abb. 3 beschrieben. Der Einsatz verschiedener Replikationsorigins und Resistenzgene in den Plasmiden pJK165 und pJK257 ermöglicht die Kopropagierung beider Plasmide innerhalb einer Bakterienzelle.

Beispiel 4

Der entwickelte E. coli Stamm JK321 ermöglicht die Igaß-vermittelte Exposition variabler Antikörperdomänen auf der Zelloberfläche und die Bindung des spezifischen Antigens.

Der Einsatz des entwickelten E. coli Stammes JK321 ermöglicht die Präsentation von Antikörperfragmenten auf der

Zelloberfläche (Abb. 4 und 5). Hierbei ist sowohl die Produktion einzelner VH- oder VL-Igα Fusionsproteine (z.B. pJK165 oder pJK257), als auch die simultane Produktion der VL- und VH-igα Fusionen von zwei Plasmiden (z.B. pJK165 und pJK257) innerhalb einer Bakterienzelle möglich. Im letzteren Fall werden beide Fusionsproteine voneinander getrennt in die äußere Membran transportiert, wo sich die einzelnen VL- und VH-Domänen der Fusionsproteine zu einem Fv-Fragment zusammenlagern. Dabei erfolgt die Exposition der VL- und VH-Igα Fusionen als ein Fv-Igα Heterodimer auf der Zelloberfläche von E. coli JK321. Rekombinante E. coli JK321, die heterodimere VH-/VL-Igα Fusionsproteine auf die Zelloberfläche exportieren, binden über ihre Immunglobulinanteile das spezifische Antigen (Abb. 5). Ferner lassen sich rekombinante E. coli JK321 Zellen, welche die VH- und VL-Igα Fusionsproteine innerhalb einer Bakterienzelle von zwei Plasmiden koexprimieren, durch Einsatz des spezifischen Antigens aus einer Verdünnung gegen E. coli JK321 Zellen, die andere, unspezifische Igα-Fusionsproteine (z.B. CtxB-Igα, Plasmid pTK59) exportieren, anreichern (Abb. 7).

Beispiel 5

Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis der angereicherten, antikörperpräsentierenden E. coli JK321 Zellen.

Im Anschluß von Experimenten zur Selektion von rekombinanten Bakterien, die Antikörperfragmente mit einer definierten Antigenspezifität auf der Zelloberfläche präsentieren, ist es erforderlich, die Identität der, mit Hilfe des spezifischen Antigens, angereicherten Klone festzustellen. Eine Möglichkeit, exklusiv E. coli Zellen nachzuweisen, die Antikörperfragmente mit einer definierten Spezifität auf der Oberfläche präsentieren, besteht darin, die verwendeten Wirtszellen mit einem bestimmten genetischen Marker (z.B. einer Antibiotika-Resistenz) zu versehen. Entsprechend verfügen die E. coli JK321 Zellen über ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Rifampicin. Dazu war in

E. coli JK321 Zellen ein DNA-Fragment transformiert worden, das ein solches Resistenzgen trägt. Das DNA-Fragment rekombinierte in das Genom von E. coli JK321 und führte zur Ausprägung der Rifampicin-Resistenz. Diese zusätzliche Eigenschaft der E. coli JK321 Wirtszellen erlaubt nur das selektive Wachstum der rekombinanten E. coli Klone auf Rifampicin-haltigem Medium, die simultan VL- und VH-Igα Fusionen mit einer, vor dem Experiment ausgewählten, definierten Spezifität präsentieren. Die verwendeten rekombinanten Kontrollzellen (z.B. E. coli UT5600), die simultan VL- und VH-Igα Fusionen mit einer anderen Antigenspezifität auf der Zelloberfläche präsentieren, sind sensitiv gegenüber Rifampicin. Der Einsatz von Wirtszellen, die gegenüber Rifampicin resistent (JK321) oder sensitiv (UT5600) sind, ermöglicht die eindeutige Identifizierung der spezifischen, antikörperpräsentierenden Zellen (Abb.6).

Patentansprüche

1. Bakterium zur Herstellung von mindestens einem stabilen Fusionsprotein aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei das Bakterium das genetische Merkmal fpt aufweist.
2. Bakterium nach Anspruch 1, wobei das Fusionsprotein stabil auf der Oberfläche präsentiert wird, das Bakterium gram-negativ ist und außerdem die genetischen Marker ompT⁻ und dsbA⁻ aufweist.
3. Bakterium nach Anspruch 1 oder 2, wobei das im Fusionsprotein enthaltene Trägerprotein das Igaß-Protein enthält oder ein Fragment davon, das die Sezernierung des Fusionsproteins ermöglicht.
4. Bakterium nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Passagierprotein ein Protein mit einer Affinität für einen Bindungspartner, ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers, ein Antigen, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Inhibitor, ein Rezeptor, ein Ligand oder ein Nucleinsäure-bindendes Protein ist.
5. E. coli JK 321 (DSM 8860).
6. Genetischer Marker fpt zur Erzeugung einer Toleranz von Bakterien gegenüber Fusionsproteinen, der sich zwischen Position 85 und 89 Minuten der Genkarte des E. coli-Genoms befindet.
7. Verwendung des genetischen Markers nach Anspruch 6 zur Herstellung von Bakterien, die tolerant gegenüber Fusionsproteinen sind.

8. Verfahren zur Identifizierung von Bakterien, die Proteine mit einer Affinität für einen Bindungspartner stabil auf ihrer Oberfläche präsentieren, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
- (a) Konstruktion mindestens eines Vektors mit mindestens einer DNA-Sequenz, die ein Fusionsprotein aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein codiert, das stabil an der Oberfläche eines Bakteriums nach einem der Ansprüche 2 bis 5 präsentiert werden kann;
 - (b) Einbringen des Vektors in Bakterien nach einem der Ansprüche 2 bis 5;
 - (c) Anzucht des Bakteriums aus Schritt (b), so daß die Bakterien der erhaltenen Kultur auf ihrer Oberfläche das Fusionsprotein oder die Fusionsproteine stabil präsentieren;
 - (d) Isolierung von Bakterien, die das gewünschte Fusionsprotein oder die Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei zur Konstruktion des Vektors in Schritt (a) eine Bank von DNA-Sequenzen verwendet wird, in der die jeweiligen DNA-Sequenzen Varianten des Passagierproteins oder der Passagierproteine codieren.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei zur Konstruktion des Vektors in Schritt (a) eine Bank von DNA-Sequenzen verwendet wird, in der die jeweiligen DNA-Sequenzen Varianten des Trägerproteins oder der Trägerproteine codieren.
11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Anzucht des Bakteriums in Schritt (c) unter Bedingungen erfolgt, bei denen die das Fusionsprotein bzw. die die Fusionsproteine codierende DNA-Sequenz mutiert wird, so daß die Bakterien der erhaltenen Kultur Varianten

des Fusionsproteins oder der Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei das im Fusionsprotein enthaltene Trägerprotein das Igaß-Protein enthält oder ein Fragment davon, das die Sezernierung des Fusionsproteins ermöglicht.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, wobei das Protein mit einer Affinität für einen Bindungspartner ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers, ein Antigen, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Inhibitor, ein Rezeptor, ein Ligand oder ein Nucleinsäure-bindendes Protein ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 13, wobei die Bakterien, die das gewünschte Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren, isoliert werden durch Interaktion mit dem an eine Matrix gebundenen Bindungspartner des Passagierproteins, durch Interaktion mit einem fluoreszenz-markierten Bindungspartner oder durch Interaktion mit dem an Magnetpartikel gebundenen Bindungspartner des Passagierproteins.
15. Gram-negatives Bakterium, das auf seiner Oberfläche stabil mindestens ein Fusionsprotein präsentiert und die genetischen Merkmale *fpt*, *ompT*⁻ und *dsbA*⁻ aufweist.
16. Bakterium nach Anspruch 15, wobei das im Fusionsprotein enthaltene Trägerprotein das Igaß-Protein enthält oder ein Fragment davon, das die Sezernierung des Fusionsproteins ermöglicht.

17. Bakterium nach Anspruch 15 bis 16, wobei das Passagierprotein ein Protein mit einer Affinität für einen Bindungspartner, ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers, ein Antigen, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Inhibitor, ein Rezeptor, ein Ligand oder ein Nucleinsäure-bindendes Protein ist.
18. Verwendung von Bakterien nach einem der Ansprüche 15 bis 17 für diagnostische Zwecke, zur Herstellung von Proteinen mit einer Affinität für einen Bindungspartner, zur Waschmittelherstellung, zur Erschließung von Rohstoffen, zur Lebensmittelverarbeitung oder zum Abbau oder der Anreicherung von Schadstoffen.

1/11

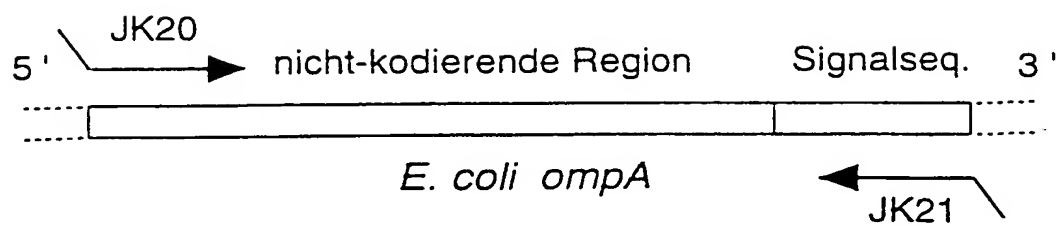
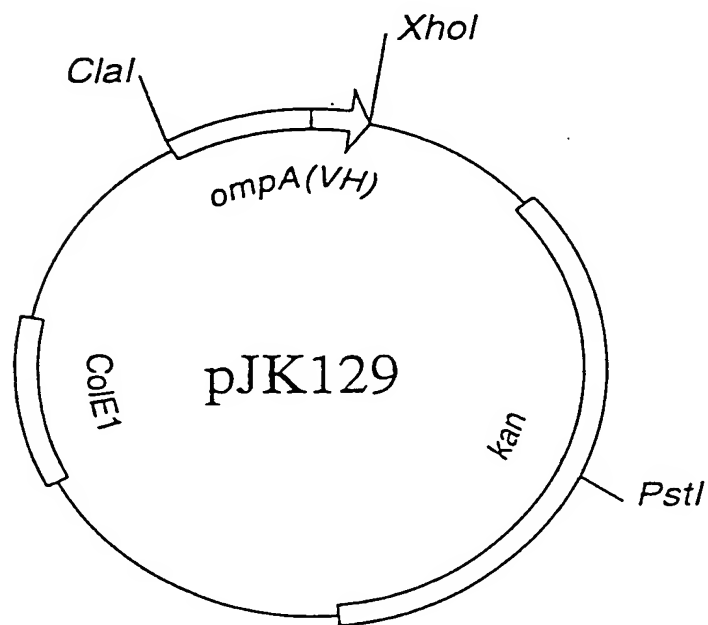
**PCR**pCR1000
-Vektor

Fig. 1.1

2/11

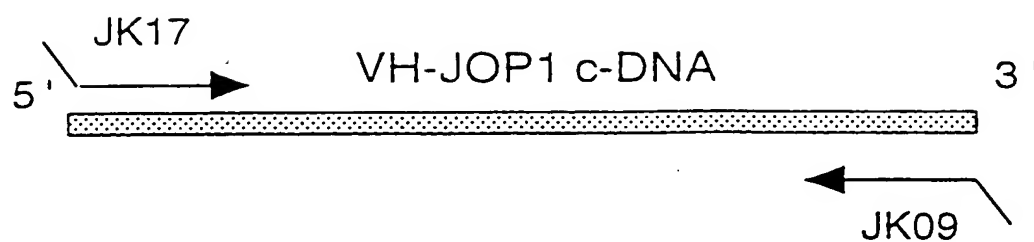
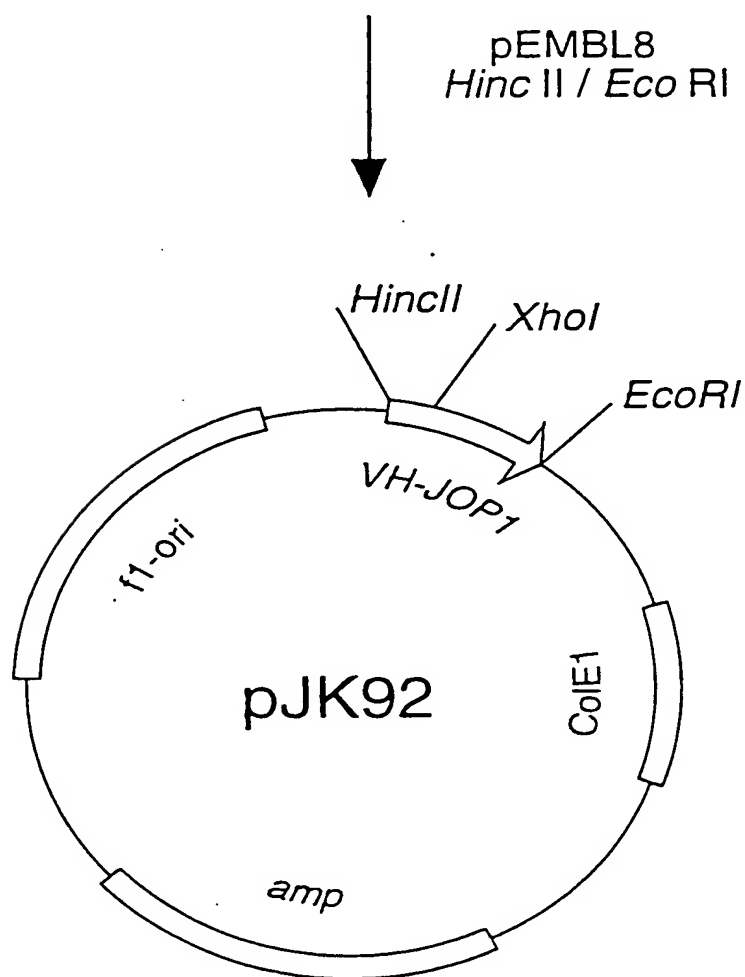
**PCR**

Fig. 1.2

3/11

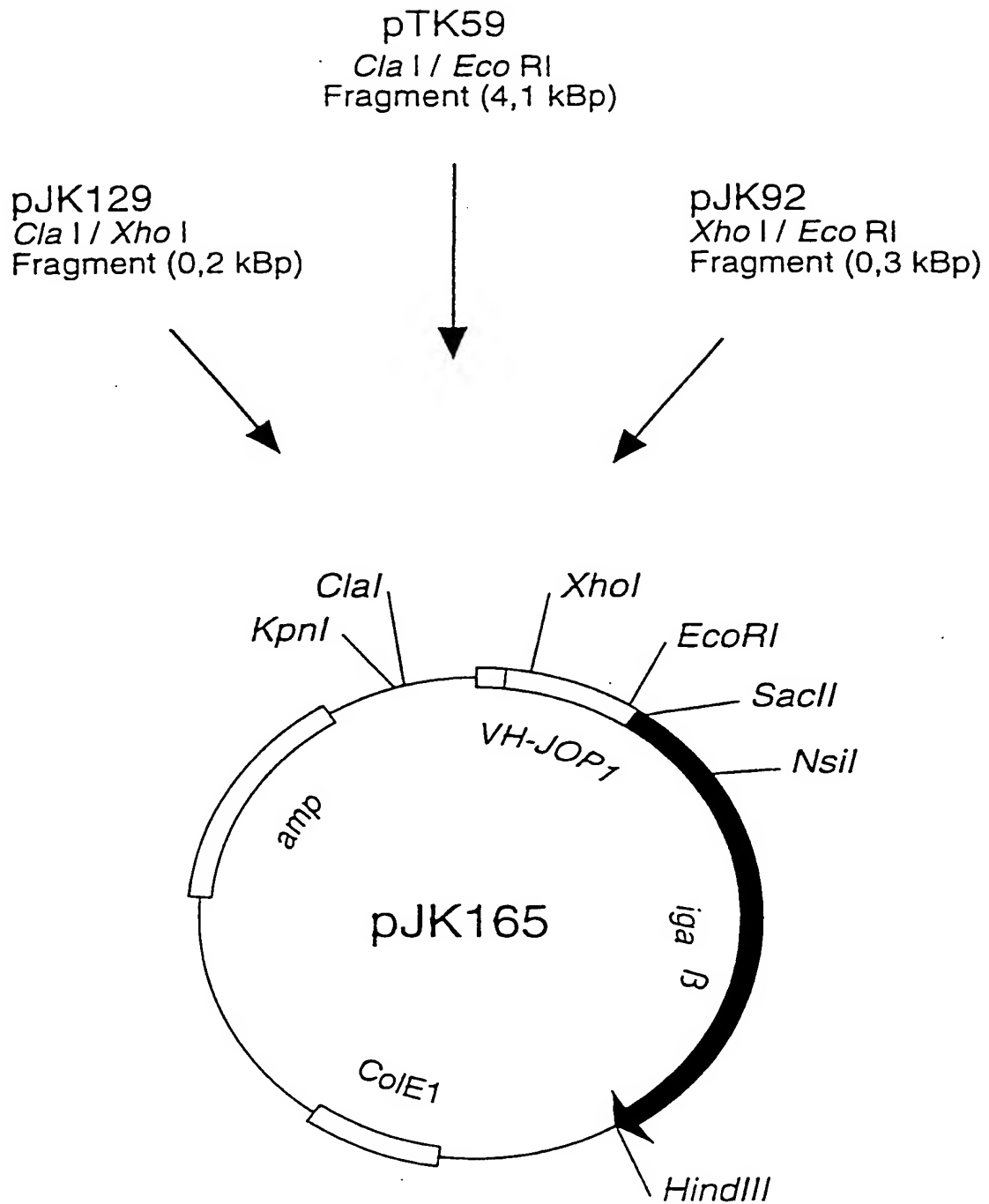
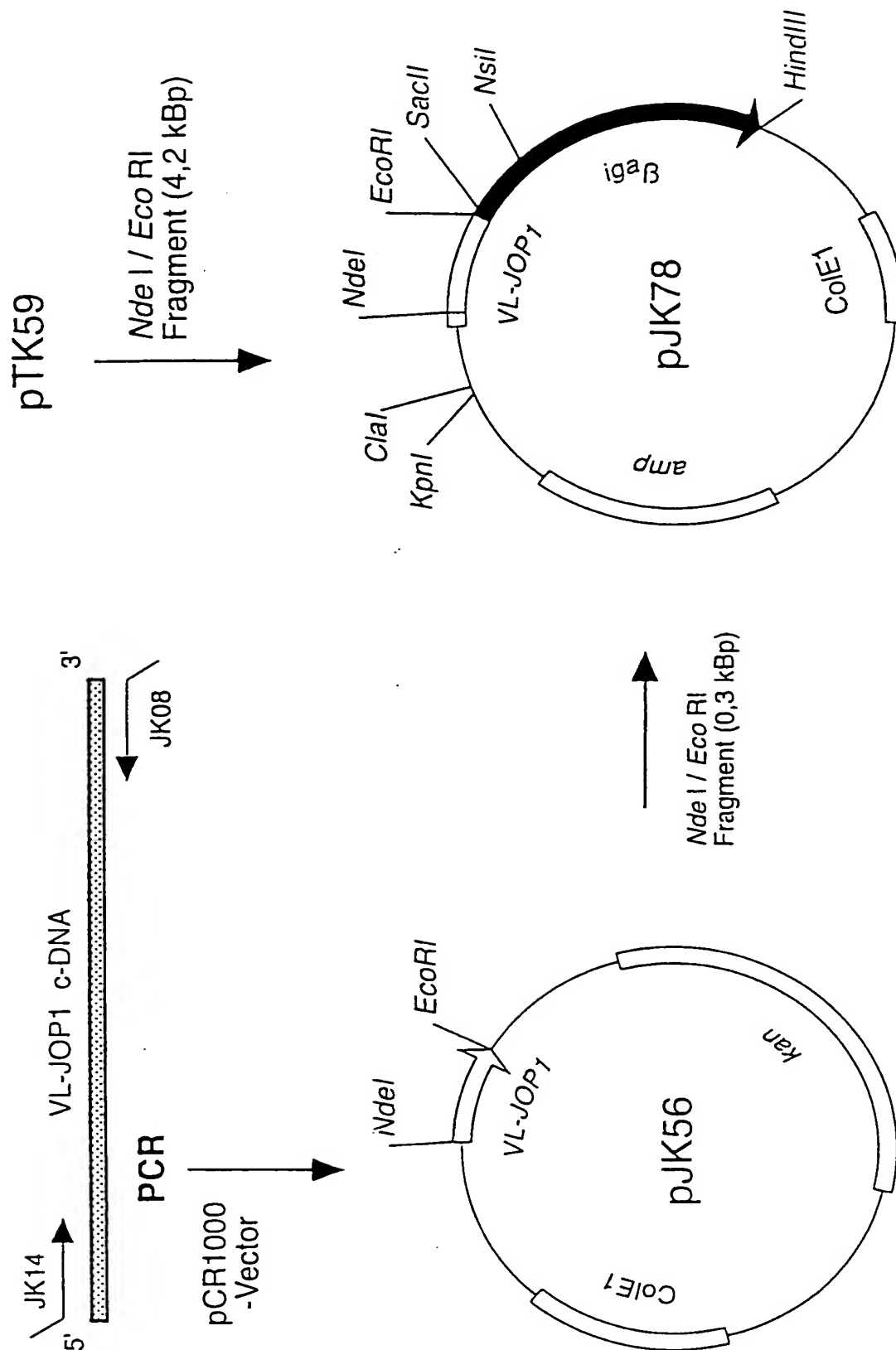


Fig. 1.3

4/11

Fig. 2 a)



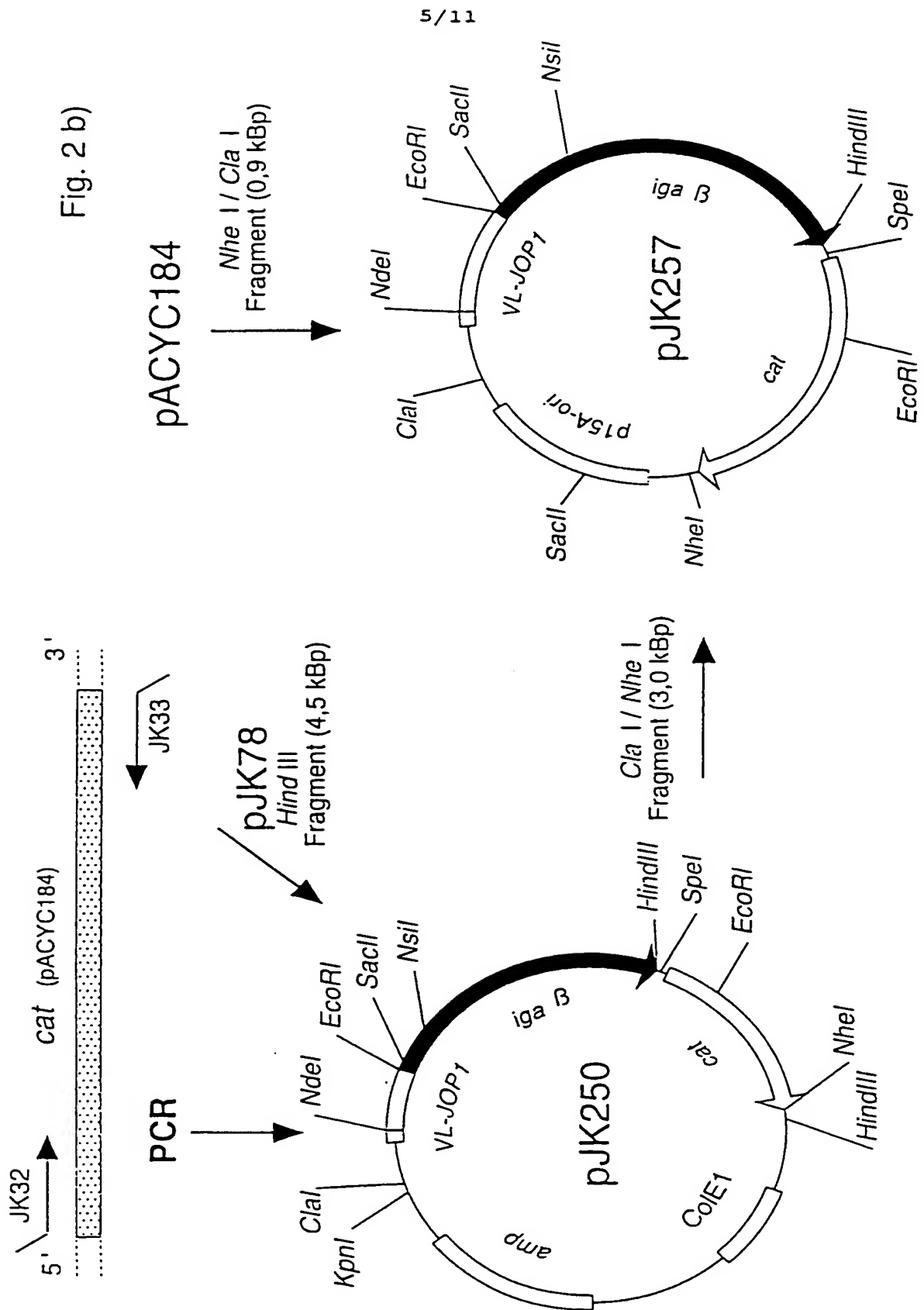


Fig. 3 a)

pJK165:

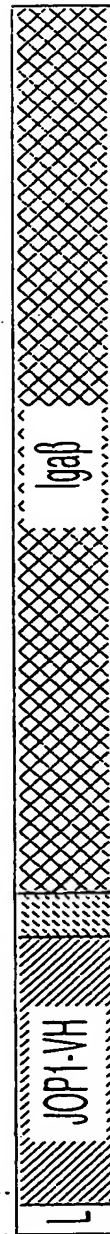
ompA mRNA

C/a! -10

Sequence alignment

M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q A A^{*} P^{*} Q V Q .

Figure 1



ECORI

Sac!

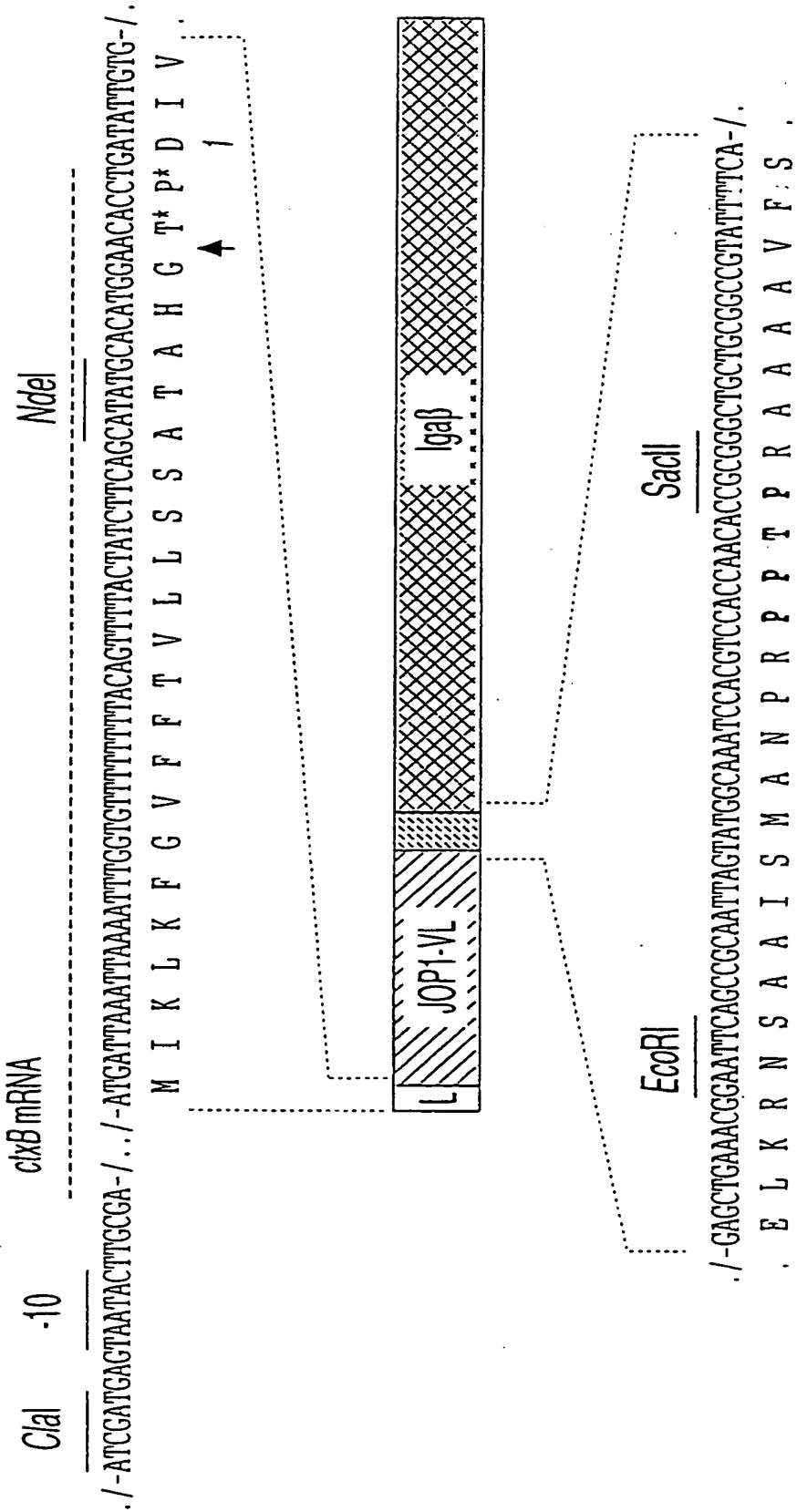
5'-GTCTCTGCGAATTCAGCCGCAATTAGTATGGCAATCCAGTCCACCAACCGGGGCTGCTGGCGCGGTAATTTTCA-3'

V S A N S A A I S M A N P R P P T P R A A A V F S .

118

1097

Fig. 3 b)
pJK78:
(pJK257)



1097

112

8/11

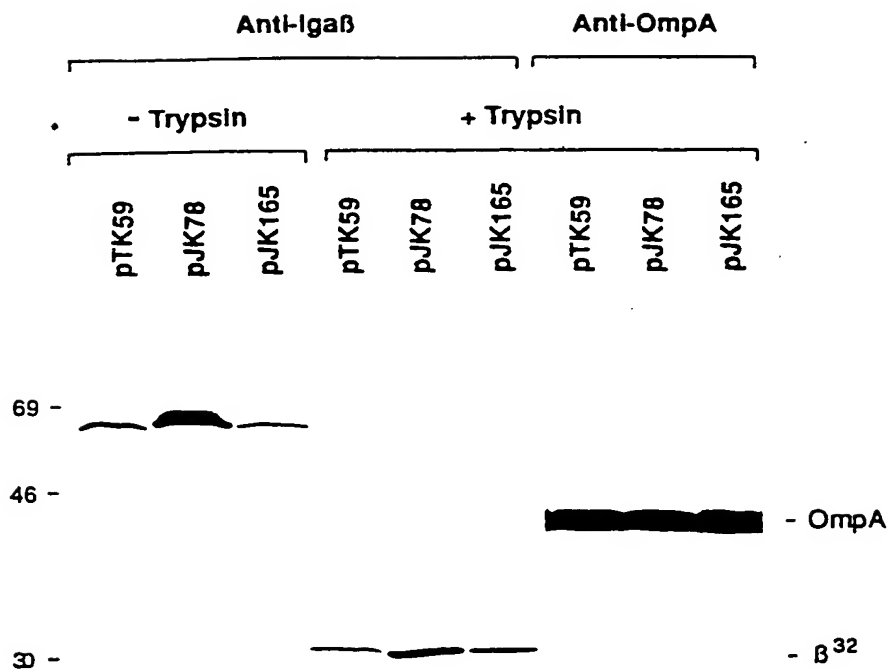


Fig. 4

9/11

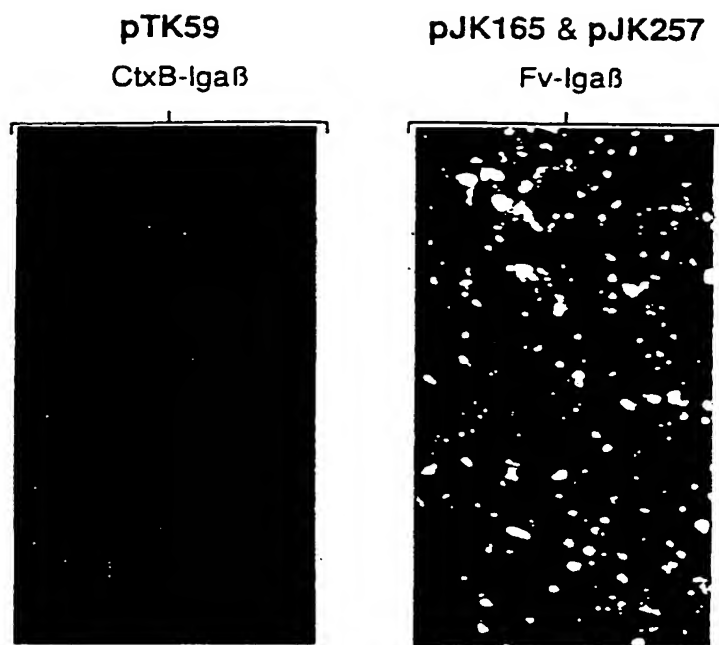


Fig. 5

10/11

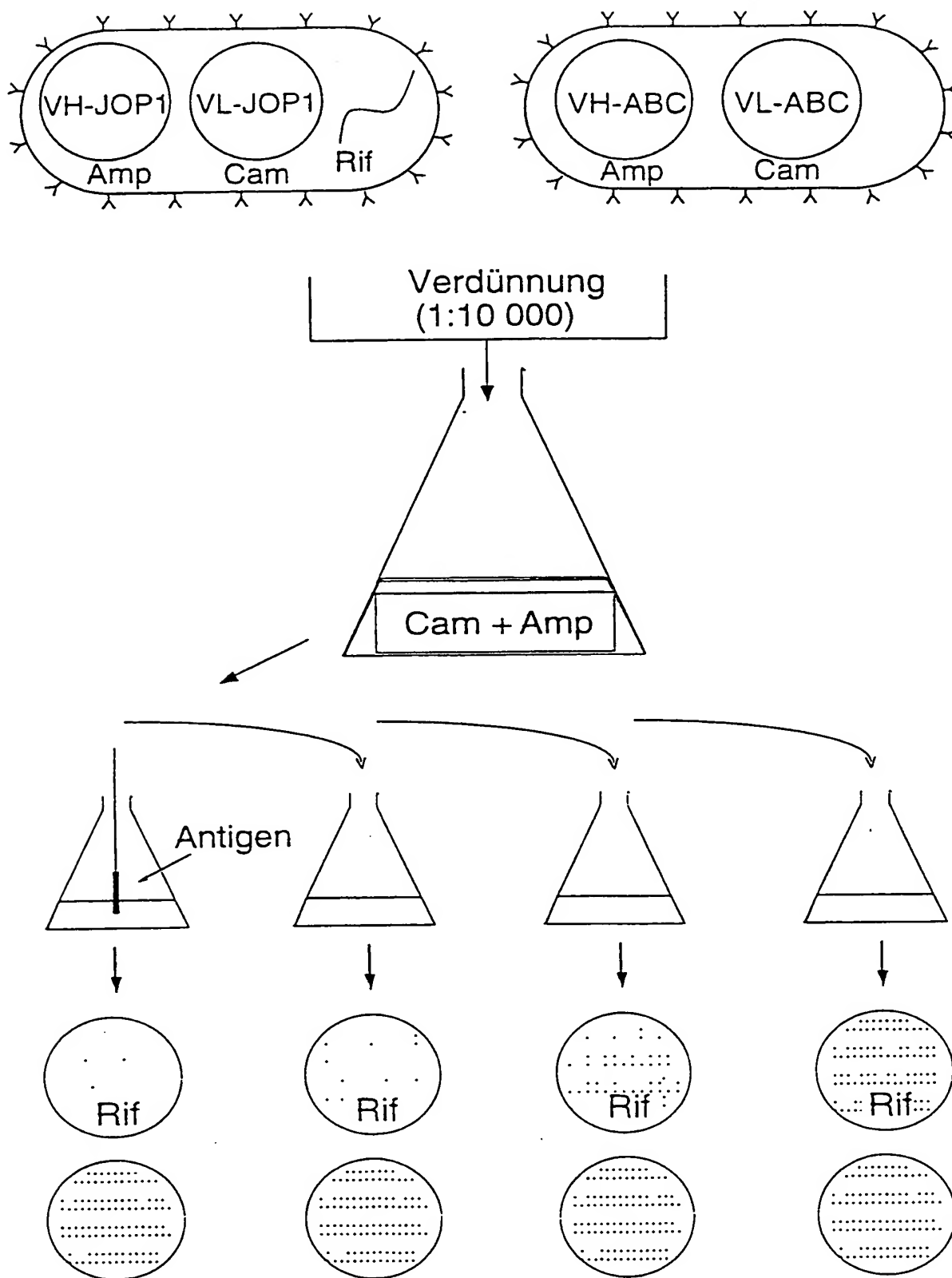


Fig. 6

11/11

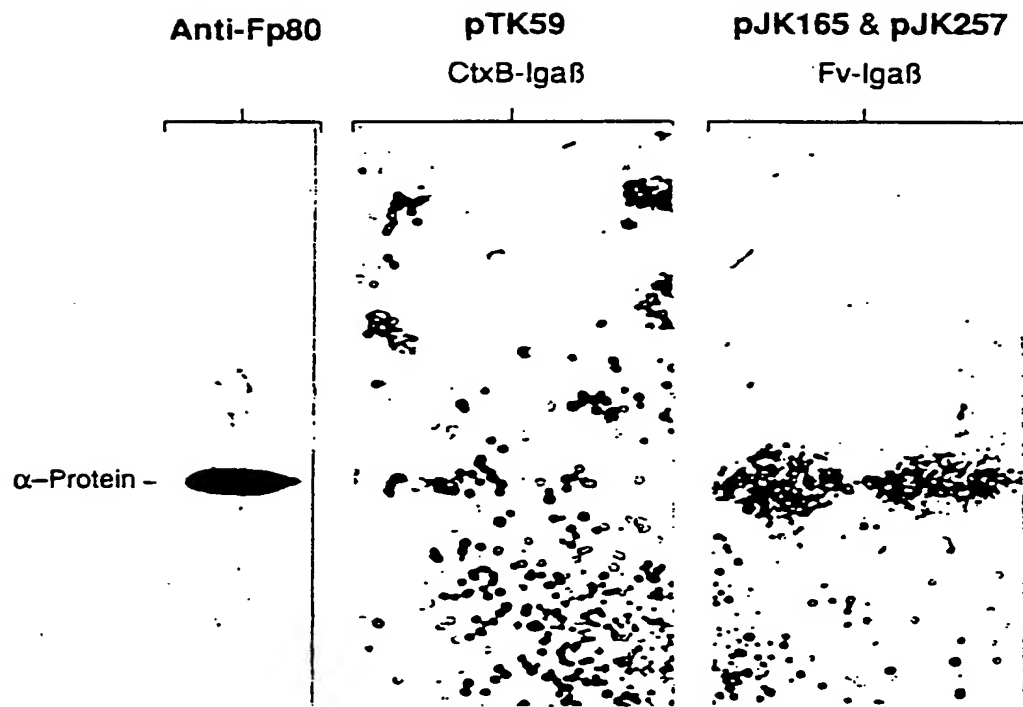


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/EP 94/04286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/10 C12N15/70
 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GENE, vol. 130, no. 2, 25 August 1993 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL;; pages 121-126, J. POHLNER ET AL. 'A plasmid system for high-level expression and in vitro processing of recombinant proteins' see page 122, left column, paragraph 2 - page 126, left column, line 3 --- -/--</p>	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 March 1995

Date of mailing of the international search report

07 APR 1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/EP 94/04286

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EMBO J., vol. 11,no. 6, June 1992 OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;; pages 2327-2335, T. KLAUSER ET AL. 'Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria Igabeta-mediated outer membrane transport' cited in the application see page 2328, left column, paragraph 2 - page 2334, left column, line 2 ---	1-18
A	CELL, vol. 67,no. 3, 1 November 1991 CELL PRESS,CAMBRIDGE,MA,US;; pages 581-589, J.C.A. BRADWELL ET AL. 'Identification of a protein required for disulfid bond formation in vivo' cited in the application see page 583, right column, line 35 - page 587, right column, line 7; figure 4; table 1 ---	1-18
A	WO,A,93 01287 (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21 January 1993 see whole document ---	1-18
A	WO,A,93 10214 (GEORGIU GEORGE) 27 May 1993 see whole document ---	1-18
A	WO,A,91 11520 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 8 August 1991 see whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: al Application No
PCT/EP 94/04286

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9301287	21-01-93	DE-C-	4122598	30-07-92
		EP-A-	0547200	23-06-93
		JP-T-	6501395	17-02-94

WO-A-9310214	27-05-93	US-A-	5348867	20-09-94
		CA-A-	2123676	27-05-93

WO-A-9111520	08-08-91	DE-A-	4015922	21-11-91
		DE-A-	4039415	08-08-91
		AU-B-	638309	24-06-93
		AU-A-	7149691	21-08-91
		EP-A-	0513073	19-11-92
		EP-A-	0602688	22-06-94
		JP-T-	5501360	18-03-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: des Aktenzeichen

PCT/EP 94/04286

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/10 C12N15/70
 C12N1/21 //(C12N1/21, C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GENE, Bd. 130, Nr. 2, 25. August 1993 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL;; Seiten 121-126, J. POHLNER ET AL. 'A plasmid system for high-level expression and in vitro processing of recombinant proteins' siehe Seite 122, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 126, linke Spalte, Zeile 3 --- -/--</p>	1-18



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. März 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07 APR 1995

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EMBO J., Bd. 11,Nr. 6, Juni 1992 OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;; Seiten 2327-2335, T. KLAUSER ET AL. 'Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria Igabeta-mediated outer membrane transport' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2328, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 2334, linke Spalte, Zeile 2 ---	1-18
A	CELL, Bd. 67,Nr. 3, 1.November 1991 CELL PRESS,CAMBRIDGE,MA,US;; Seiten 581-589, J.C.A. BRADWELL ET AL. 'Identification of a protein required for disulfid bond formation in vivo' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 583, rechte Spalte, Zeile 35 - Seite 587, rechte Spalte, Zeile 7; Abbildung 4; Tabelle 1 ---	1-18
A	WO,A,93 01287 (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21.Januar 1993 insgesamt ---	1-18
A	WO,A,93 10214 (GEORGIU GEORGE) 27.Mai 1993 insgesamt ---	1-18
A	WO,A,91 11520 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 8.August 1991 insgesamt -----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/04286

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9301287	21-01-93	DE-C- 4122598 EP-A- 0547200 JP-T- 6501395	30-07-92 23-06-93 17-02-94
WO-A-9310214	27-05-93	US-A- 5348867 CA-A- 2123676	20-09-94 27-05-93
WO-A-9111520	08-08-91	DE-A- 4015922 DE-A- 4039415 AU-B- 638309 AU-A- 7149691 EP-A- 0513073 EP-A- 0602688 JP-T- 5501360	21-11-91 08-08-91 24-06-93 21-08-91 19-11-92 22-06-94 18-03-93